

12. 獣医科学部

部長 山田章雄

概要

平成20年度は獣医科学部として急な対応を必要とするような突発的な感染症の発生は認められず、比較的落ち着いた環境で研究業務等に集中できたと思われる。獣医科学部が動物由来感染症に関する研究に特化することで新たにスタートを切って以来努力を続けてきた外部との協力関係の構築もスムーズに進んできている。なかでも衛生微生物技術協議会のレファレンスセンターのなかに人獣共通感染症レファレンスセンターが設立されたことの意義は大きい。また、感染研と海外研究機関の連携が進み、ソウルで開催された日・中・韓シンポジウムにおいても人獣共通感染症を話題の一部として取り上げていただき、One Healthの考えのもとさまざまな機関の連携について議論を深めることができた。またベトナム衛生疫学研究所とも同様の枠組みの中で共同研究をすすめることが合意され、共同研究がスタートした。また、厚生労働科研費（研究代表者：渡邊副所長）の補助により中国、フィリピンとも共同研究が進められている。一方、岐阜大学連合獣医学研究科との連携機関であることからモンゴル出身の留学生を受け入れたことがきっかけで、モンゴルとの協力関係も深まり、モンゴル国立感染症疫学センターと獣医科学部の間で共同研究に関する覚書が交わされた。これら以外にも活発な所内の各研究部や外部の様々な研究機関とも分野ごとに共同研究がすすめられた。このように国内外の研究機関との協力関係が深まったことにより、人獣共通感染症の理解と制御に欠かせないOne Healthコンセプトを実現してゆく上で重要な一歩を進めることができたと考えられる。

業績

調査・研究

I. 動物由来感染症に関する研究

1. *Brucella* 特異的抗体検出法の開発に関する研究

試験管内凝集反応（TAT）に代わる抗体検出法として、マイクロプレート凝集反応（MAT）を開発し、その有用性を示した。さらに、不活化菌体または熱水抽出物（HSE）を抗原としたELISAおよび、市販の免疫クロマト法（IC）

KITを入手し検討した。その結果、MATとTATでは、結果に良好な相関が見られ、感度はMATの方が良かった。IC KitはMATと同等の感度と特異性を示した。ELISAは相関がやや劣っていたが、スクリーニングには使用可能であった。ELISA法及びin-houseの免疫クロマト法に用いる組換えタンパクの作成を行い、検証を進めている。[木村昌伸、鈴木道雄、今岡浩一]

2. *Brucella canis* 感染症例とその背景、事後対応

イヌ繁殖業者2名が*B. canis*に感染・発症したことを受けて、その背景の解析と事後対応への協力を行った。繁殖施設のイヌ、患者及び関係者の抗体検査、遺伝子検出、菌分離などを行った。また、発症の8ヶ月前にさかのぼり、すでに販売されていた抗体陽性犬の産仔の追跡調査を行った。患者からは*B. canis*が分離された。施設のイヌは37頭のうち、10頭が抗体陽性、9頭からPCR陽性、また6頭の血液から*B. canis*が分離された。抗体陽性犬から死産した仔犬を処理したことが、感染原因と推定された。患者家族、病院検査室職員、獣医師は陰性であった。厚生労働省より、各自治体、日本獣医師会等、関係機関に注意喚起が行われた。国内の犬繁殖施設等では*B. canis*感染流行がしばしば報告されており、また、国内のイヌの2~5%が*B. canis*に感染歴を持っている。犬取扱業者や一般飼育者に対して予防に関する指導が必要である。[今岡浩一、木村昌伸、鈴木道雄（感染研・獣医科学部）、野村篤史、志水英明（中部労災病院・腎臓内科）今西一（中部労災病院・感染管理室）]

3. 国内野生イノシシ・シカにおける抗*Brucella*抗体の保有状況に関する研究

昨年度に続き、国内の野生イノシシおよびシカの血液サンプルを入手し、ブルセラ属菌に対する抗体の保有状況を検討した。家畜ブルセラ菌に対する抗体は昨年度と同様検出されなかった。しかしながら、イヌブルセラ菌に対する抗体を検討したところ、溶血の影響を除外しても、2008-9年シーズンのサンプルで4/77のイノシシ及び1/52のシカで凝集が認められた。イヌブルセラ菌は国内に定着しているが、今回、イノシシ及びシカで陽性反応

が見られたことについては、非特異的反応や他の細菌との交差反応の可能性など、さらに詳細に検討していく必要がある。[今岡浩一、木村昌伸、鈴木道雄、山田章雄]

4. カブノサイトファーガ属菌およびパスツレラ属菌に関する疫学的調査・研究

カブノサイトファーガ属菌はイヌやネコの口腔内に常在するグラム陰性桿菌であり、ヒトがイヌやネコに咬傷、搔傷を受けた際に傷口から感染することなどによって種々の症状を呈し、発症した場合の死亡率は30%程度と比較的高い。これまでに、日本国内のイヌ・ネコともに90%以上の高率でカブノサイトファーガ属菌を保有していることを明らかにしてきた。本年度は臨床症例の調査に努めるとともに、収集した臨床分離株について、イヌ・ネコからの分離株と合わせて薬剤感受性試験を行った。*C. canimorsus* はアミノグリコシド系に対しては概ね耐性（あるいは中間）で、クリンダマイシンやエリスロマイシンに対しても耐性（あるいは中間）株があった。クロラムフェニコールやセフトキシムは *C. canimorsus* および *P. multocida* とともにほぼすべての株が感受性であった。以上のことから、 β ラクターマーゼ産生の影響を受けにくい β ラクタム系の抗生物質およびテトラサイクリン系、セフェム系の抗生物質がイヌ・ネコ咬傷感染症の治療に有効である事を明らかにした。

今後も継続して、各症例における特徴的な所見など情報の収集と、得られた菌株の解析、カブノサイトファーガ属菌の感染・発症メカニズムについて解明しておくことも重要である。[鈴木道雄、木村昌伸、山田章雄、今岡浩一]

5. 狂犬病に関する研究

(1) 狂犬病の診断技術向上のための解剖手技習得モデル・教材の開発に関する研究

狂犬病は現在国内で発生していないが、海外からの侵入が憂慮される動物由来感染症であることから国内に侵入した感染動物を早期に察知するためには診断技術向上に有効な実習用モデル・教育訓練教材等が必要不可欠である。狂犬病の診断技術向上のために必要な解剖手技習得モデル・教材として(1)解剖手順習得モデル、(2)実技取得モデル、(3)脳モデルのプロトタイプを作成し、自治体関係機関の現場担当者等とともに教材として実際的な使用を行うために必要な改良点や課題点について検討を行った。[井上 智、野口 章、加来義浩、奥谷晶子、山田章雄(獣医科学部)、千葉 操、志村 薫(アペックスパイオサイエンス研究所)、川田 睦、王寺 隆(ネオ・ベッツ VR センター)、織間博光、長谷川大輔(日本獣医生命科学大学)、佐藤 克(狂犬病臨床研究会)、宗村佳

子(東京都動物愛護相談センター)、沼田一三、川島 朗、神田 郁、齋藤竜彦(兵庫県動物愛護センター)、西條和芳(徳島県保健福祉部生活衛生課)、矢野さやか(徳島県徳島保健所)、堀元栄詞(富山県衛生研究所)、小川知子(千葉県衛生研究所)、明石 誠(千葉県動物愛護センター)、木山真大(鳥取県生活環境部公園自然課)、川瀬 遵(島根県健康福祉部)、松本尚美(鳥取県衛生環境研究所)]

(2) 狂犬病の臨床診断に必要な教材開発に関する研究
獣医師および自治体の狂犬病予防員等による狂犬病の疑われるイヌの臨床判断が容易とするために、狂犬病を発症したイヌの臨床診断カルテの素案をタイの赤十字研究所狂犬病診断部(QSMI)および狂犬病臨床研究会との共同研究により作成した。現在、狂犬病診断部(QSMI)とともに狂犬病を発症したイヌの症例映像記録を利用してカルテの妥当性について分析をおこなっている。[佐藤克(狂犬病臨床研究会)、Veera Tepsumethanon(QSMI)、井上 智(獣医科学部)]

(3) アジアの研究機関との連携におけるラボラトリーネットワークの強化に関する研究

アジアのCDC機能を持つ国立の研究機関等との連携による狂犬病ウイルスの最新のゲノムデータベース構築とこれを活用した分子疫学的解析手法の開発、新しい診断法の開発を目的とした。

a) 狂犬病ウイルスの分子疫学に関する研究

アジアで流行している狂犬病ウイルスの分子疫学的解析をフルゲノムで可能とするために必要となる増幅プライマーの設計とこのプライマーを利用した実験株

(CVS-11株)と野外株(フィリピン由来株)のフルゲノムシーケンスを行った。現在、委託研究を行っているフィリピンの熱帯医学研究所(RITM)、ベトナムの国立衛生疫学研究所(NIHE)、中国の疾病制御センター(China CDC)の狂犬病研究部とともにゲノムデータを利用した診断用プライマーの設計、分子疫学データベース構築についてラボラトリーネットワークの強化を行っている。[井上 智、杉浦尚子、Boldbaatar Bazartseren、野口 章、山田章雄(獣医科学部)、黒田 誠、関塚剛史(病原体ゲノム解析研究センター)、Jun R.C. Orbina、Catalino Demetria、Daraia L. Manalo、Plebiana Medina、Beatriz Quiambao(RITM)、Nguyen Thi Kieu Anh(NIHE)、Qing Tang(China CDC)]

b) 狂犬病ウイルスの迅速抗原検出系に関する研究

狂犬病ウイルスの迅速抗原検出法「dRIT法 (a direct, rapid immunohistochemical test)」を、実験株 (CVS11株) 由来の組換えN蛋白をウサギに免疫して得られた抗N蛋白 monospecific-polyclonal Abs (mpAbs) を利用して確立した (mpAbs-dRIT法)。検出用 mpAbs をビオチン標識後、Streptavidin-Peroxidase と AEC 基質による発色系で狂犬病ウイルス N 抗原の検出を行った。狂犬病ウイルス感染マウス脳塗抹標本を陽性検体として N 抗原の検出を mpAbs-dRIT 法で行ったところ、市販の蛍光標識診断用抗体と遜色なく抗原を検出できることが示された。なお、mpAbs-dRIT 法の特異性等については、フィリピン熱帯医学研究所 (RITM) 狂犬病診断チームと連携して野外での調査等を委託研究で行った。[朴 天鎬、小嶋大亮 (北里大学)、Beatriz Quiambao、Catalino Demetria (RITM)、Boldbaatar Bazartseren、杉浦尚子、野口 章、井上 智 (獣医科学部)]

c) 狂犬病ウイルスの迅速遺伝子検出系に関する研究

新しい迅速遺伝子検出法として「RT-LAMP法 (reverse transcription loop-mediated isothermal amplification)」を CVS11 株 (固定毒) とフィリピン由来 Kyoto 株 (街上毒: 2006 年の輸入狂犬病症例) を利用して確立した。現在、ベトナムの国立衛生疫学研究所 (NIHE) と連携して野外検体を利用した RT-LAMP 法の検出感度と特異性について協同研究を進めている。[Boldbaatar Bazartseren、野口章、山田章雄、井上 智 (獣医科学部)、Jun R.C. Orbina、Catalino Demetria、Daraia L. Manalo、Beatriz Quiambao (RITM)、Nguyen Thi Kieu Anh (NIHE)]

(4) 狂犬病の免疫グロブリンに関する研究

我が国ではこれまでに RIG の生産も輸入も行われていないため、免疫グロブリン (RIG: rabies immunoglobulin) についての知見等が蓄積されていない。昨年と同様に Aventis Behring 社から輸入した RIG の力価について、冷蔵状態 (4℃) で長期保存後の安定性を確認した。結果、有効期限を 3 年経過した状態でも RIG の中和抗体価は昨年と同様に製品表示の基準値と遜色のない力価が維持されていることが示された。[野口 章、井上 智 (獣医科学部)、倉根一郎 (ウイルス一部)]

(5) ELISA を利用したイヌ血清中抗狂犬病ウイルス中和抗体測定代替法の検討

狂犬病ワクチン接種犬の中和抗体測定に生ウイルスを使用しない安全で簡便な方法として ELISA を利用した代替法の検討を行っている。現在、中和法 (RFFIT) と ELISA 法で高い相関が示されたが、陽性率で若干の差異

が認められたため感度と精度を高めるために試薬・反応系の改良を行っている。[野口 章、加来義浩、奥谷晶子、井上 智 (獣医科学部)、松本尚美 (鳥取県衛生環境研究所)、小川知子 (千葉県衛生研究所)]

(6) 狂犬病の診断法確立に関する研究

より安価に特異抗体を生産可能な方法として、免疫グロブリン V_H 鎖、V_L 鎖の抗原結合領域だけから構成される小型の抗体様分子である「single chain variable fragment (scFv)」を利用した狂犬病の抗原診断法の確立を試みた。今回、狂犬病ウイルス (CVS-11) P 蛋白質に対する 4 種類のヘテロなクローン「scFv」(No.19、38、80、115) の作出に成功した。蛍光標識した 4 つのクローンはいずれも感染細胞中の狂犬病ウイルス (CVS-11) 抗原に特異的に反応することが確かめられた。作出した scFv の反応性と特異性については検討の余地が残されているが、標識-抗 RV-P scFv が狂犬病ウイルスの抗原検出系に利用できることが示された。[加来 義浩、野口 章、井上 智 (獣医科学部)]

(7) 狂犬病野外ブラジル株を用いた In vivo 接種試験

狂犬病野外株の馴化のメカニズムを解明するために、州立サンパウロ大学 (ブラジル) の協力のもと、食虫コウモリおよび家畜 (ウシ・ヒツジ) より分離された株をマウス脳内で 4~11 代継代した。継代数の増加につれ潜伏期間は短縮していく傾向を見せ、末梢感染後の死亡率も上昇した。現在、継代前/継代後で見られた表現系の違いがウイルスの遺伝子変異に基づくものかについてゲノム解析等を行っている。[佐藤 豪、杉浦尚子、井上 智 (獣医科学部)、朴 天鎬、小嶋大亮 (北里大学)、伊藤 琢也、酒井 健夫 (日本大学)、Ito H. Fumio (州立サンパウロ大学)]

(7) 狂犬病対策システムの構築に向けて (提言)

日本学術会議生産農学委員会獣医学分科会の審議結果を取りまとめて、狂犬病の予防や速やかな治療の実現及び我が国への侵入の阻止のために以下を提言した。

(1) 厚生労働省及び農林水産省は、国外における発生状況や流行様式の実態を正しく把握し、国民に向けた正しい狂犬病の知識と予防法の普及・啓発を行うとともに、飼育犬に対するワクチン接種率の向上を図る。

(2) 厚生労働省及び地方自治体は、国内で狂犬病が疑われた、もしくは発生した場合に備え、行政機関における対応マニュアルの作成や検査システム、医療用ワクチンの確保等の事前準備の充実を図る。(3) 動物由来感染症である狂犬病の予防対策には、医学領域

と獣医学領域の専門家及び行政の感染症担当者による相互理解と連携が重要であることから、三者を含めた情報交換システムを構築する。(4) 我が国におけるリスク要因の適切かつ継続的な調査を実施するとともに、発生源であるアジアを中心とする近隣諸国との連携による国際的な狂犬病対策に関する共同研究を推進する。[唐木英明、土井邦雄、赤堀文昭、西原真杉、春日文子、林 良博、矢野秀雄、廉澤 剛、汾陽光盛、喜田 宏、佐々木伸雄、佐藤れえ子、高島郁夫、眞鍋 昇、森 裕司、八神健一、山根義久、井上 智 (日本学術会議生産農学委員会獣医学分科会)]

6. 炭疽に関する研究

(1) MLVA 25 loci を利用した国内分離株の系統解析

国内で動物とヒトから分離された炭疽菌 12 株を MLVA25 カ所 (染色体 23 ヶ所とプラスミド 2 ヶ所) についてフラグメント解析を行った所、いずれもクラスター A3a と A3b に分類された。 [奥谷晶子、井上 智 (獣医科学部)、関塚剛史、黒田誠 (病原体ゲノム解析研究センター)]

(2) 国内分離株の病原性プラスミドの網羅的 SNP 解析

B. anthracis BA103 株および BA104 株の病原性プラスミド (pXO1 と pXO2) の全塩基配列を決定してウェブデータベース上の外国由来 17 菌株とともに網羅的 SNP 抽出を行い、系統解析を行ったところ MLVA 25 loci を利用した系統解析によるクラスター分類と一致することが明らかとなった。[関塚剛史、黒田誠 (病原体ゲノム解析研究センター)、奥谷晶子、井上智 (獣医科学部)]

(3) LAMP 法による炭疽菌遺伝子検出法の検討

山形県庄内食肉衛生検査所で、当部より分与した抽出 DNA 溶液 (*B.anthraxis*10 株、*B.cereus*3 株、*B.thuringiensis*3 株 *B.subtilis*1 株、*Escherichia coli* 1 株) を利用してリアルタイム濁度検出装置 (LA-320C) を用いた LAMP 法による迅速炭疽菌検査法の検討を行った。その結果、DNA 量 10ng/tube で 30 分以内に濁度上昇が認められ既報 (60 分) よりも迅速であり、検出感度は 1fg~10fg/tube で、制限酵素処理による増幅産物の特異性確認も可能であった。現在、検査対象である臓器等での検出感度について検討を行っている。[高杉幹男(山形県庄内食肉衛生検査所)、池田陽子(山形県内陸食肉衛生検査所)、奥谷晶子、井上智 (獣医科学部)]

7. ヘニパウイルス感染症に関する研究

(1) ニパウイルス (NiV) の抗原 capture ELISA の開発

近年、現行の診断用プライマーでは増幅できないヘニパウイルス株の出現が報告されている。そこで、ウイルス遺伝子のプライマー相当領域が変異した株でも検出できるように、capture ELISA による抗原検出系の開発を行った。昨年度までに作製した抗 NiV-F, G ウサギ抗血清から IgG を精製して固相化用/検出用抗体として用いた。NiV-F/G 発現シュードタイプをウイルス抗原として capture ELISA を行った結果、検出限界は 1.3×10^3 infectious unit であった。現在、BSL4 施設を有する豪州家畜衛生研究所で感染性 NiV を使用した capture ELISA との比較検討を計画している。 [加来義浩、野口 章、奥谷晶子、山田章雄、井上 智]

(2) ニパウイルス中和代替法の開発

NiV、ヘンドラウイルス (HeV) 抗体の血清スクリーニングには ELISA が行われているが、動物種によっては非特異反応が確認されている。確定診断には感染性ウイルスを用いた中和試験が望ましいが、BSL4 施設以外では実施できない。そこで、BSL2 以下での試験を可能とするために、NiV-F, G 蛋白を発現した VSV シュードタイプ (感染細胞で蛍光蛋白質 GFP を発現する) を用いた中和代替法の開発を行った。ヒト、ブタ、オオコウモリ、ウマ、ネコ、ウサギの NiV 感染/免疫血清に対して、上記シュードタイプによる中和試験を行い、現行の感染性ウイルスによる中和試験と反応性を比較した結果、現行法よりも高感度に中和抗体を検出できた。 [加来義浩、野口 章、奥谷晶子、山田章雄、井上 智]

行政検査および関連の問い合わせ

レファレンス関連マテリアルの分与等

・狂犬病ウイルス検査の陽性対照品

平成 20 年 6 月 (神奈川県衛生研究所): 陽性対照 RNA、サイズマーカー、N タンパク発現固定細胞

・炭疽菌検出の陽性対照品

平成 20 年 6 月: 福島衛生研究所、陽性対照遺伝子 (抽出ゲノム DNA、PCR 増幅遺伝子 (pGEM-Pac1、pGEM-CAPc3))

平成 21 年 2 月: さいたま市健康科学研究センター、PCR 増幅遺伝子 (cap と pag 遺伝子の全長)

電話対応

・狂犬病に関する問い合わせ

- 一般：5件（咬傷被害への対応等）
- 医師：2件（咬傷被害への対応等）
- 自治体：2件（咬傷被害への対応等）
- 取材等：3件（資料提供等）

- ・炭疽に関する問い合わせ
- 自治体：1件（検査法）

8. 野兔病に関する研究

（1）野鼠における野兔病菌の保有調査

環境中の野兔病菌の存在様式の解明を目的に、野兔病罹患ノウサギが発見された地点を中心に約 1km 以内に生息する野鼠を捕獲し野兔病菌の有無を調査した。ハタネズミ 31、アカネズミ 13、ヒメネズミ 9、ヒミズ 3 およびトガリネズミ 1 の計 57 匹が捕獲された。それら動物から血液、脾臓、肝臓および外部寄生虫（ダニ、ノミ、ツツガムシ）を採取した。野兔病菌に対する抗体の検出を試みたが陽性検体は認められなかった。脾臓、肝臓ならびに外部寄生虫について野兔病菌の特異的遺伝子の増幅は認められず、菌分離もされなかった。これより当地域が野兔病菌に重度に汚染されている事実はないと考えられた。

〔堀田明豊、藤田 修、宇田明彦、山本美江、棚林 清〕

（2）自然界における野兔病菌の維持様式に関する研究
野兔病菌は自然界において野生げっ歯類やノウサギなどと吸血性節足動物間で維持されていると考えられているが、現実的にこれらが巡り会う機会は非常に少ない。今回我々は、自然界における野兔病の維持様式を調べるため、野兔病に自然感染し斃死した野生ノウサギが発見された牧野において様々な自然環境材料を採取し、これらから抽出した DNA について野兔病菌ゲノムの検出を試みた。その結果、牧野に点在する池の水より分離培養したアメーバ種、斃死ノウサギが発見された場所付近の土壌、そしてダニの一部より特異的遺伝子もしくは類似菌の DNA が検出された。しかし、野兔病菌の分離はできず、さらに調査が必要と考えられる。

〔藤田 修、堀田明豊、宇田明彦、山本美恵、棚林 清〕

（3）斃死ノウサギの剖検および野兔病菌分離

秋田県内で発見された斃死ノウサギを剖検した。脾臓に多数の針頭大の白点が認められた以外、肉眼的に著変は認められなかった。脾臓、肝臓、肺および腎臓から野兔病菌特異的遺伝子断片が、また蛍光抗体法により野兔病菌抗原が検出された。これら臓器から微小灰白色コロ

ニーが分離され、野兔病菌と同定された。脾臓、肝臓、肺で $10^{7-8}/g$ 、腎臓で $5 \times 10^4/g$ の菌が検出された。これより自然感染ノウサギにおける病理像が確認でき、新規の野兔病菌株（NVF1）を確立できた。また斃死ノウサギ材料において当研究室の野兔病検査法が有効であることが示された。一方当地域で近年捕獲された健常ノウサギの 56 羽の血清抗体、脾臓、肝臓、体表付着ダニについて検査したがいずれからも異常は認められなかった。

〔堀田明豊、藤田修、山本美江、宇田晶彦、棚林清〕

（4）野兔病患者血清中抗体価の推移

同一時に感染したと考えられる野兔病患者 2 名（患者 A、B）の血清抗体価を経時的に測定した。患者 A は 8 日目に発症し、野兔病のチフス型と診断された。患者 B は無症状で抗体価の上昇のみ認められた。両者から計 5 回（推定感染源との接触後 23 日、30 日、37 日、67 日、192 日目）採血し、それぞれの抗体価を測定した。微量凝集反応試験にて、患者 A は 40、160、160、80、40 倍と、患者 B は 40、160、160、160、40 倍と、推移した。これにより、野兔病患者は発症の有無に関わらず感染後 1 ヶ月後から 2 ヶ月程高い抗体価が維持され、また 6 ヶ月程で低下することがあると示された。

〔堀田明豊、藤田修、山本美江、宇田晶彦、棚林清〕

（5）市販と自家製のチョコレート寒天培地における *Francisella* 属菌の増殖性の比較

Francisella 属菌 Yama、Schu、LVS、38 および U112 菌液について自家調製の綿羊脱線血加 Eugon チョコレート寒天培地と BBL 社チョコレート (II) 寒天培地における菌数を比較した。Schu および U112 の CFU は市販培地で自家製培地の 2 倍程多い傾向があった。他 3 株では自家製培地が 1.2 倍程多かった。自家製培地における Schu の菌数は培養 3 日後と 6 日後の測定で 10^2 の差があったが市販培地では培養 3 日後から大きな変化はなかった。これら寒天培地間では野兔病菌の増殖性は培養 6 日後では著しい差は無く、菌分離の成績には差は少ないと考えられた。また市販のチョコレート寒天培地は培養 3 日からの安定した CFU 測定に有用と考えられた。

〔堀田明豊、藤田修、山本美江、宇田晶彦、棚林清〕

9. 鳥インフルエンザに関する研究

（1）鳥インフルエンザウイルスゲノムの高感度検出法の比較検討

高病原性鳥インフルエンザの検査においてウイルスゲノム検出法として WHO の推奨する 2 種類の RT-PCR 法と 3 種類のリアルタイム RT-PCR 法で 5 株のインフルエ

ンザウイルス株〔WSN(H1N1)、PR8(H1N1)、A/Mallard/Miyazaki/MZ5/2007(H1N3)、A/duck/Hyogo/35/01(H5N1)、A/Blowfly/Kyoto/I93/2004(H5N1)〕との反応性や検出感度並びに操作性の検討を行った。鳥由来インフルエンザウイルス RNA の検出ではいずれも感度については良好な結果がえられたが所要時間についてはリアルタイム RT-PCR 法が短く、作業量も少ない事がわかった。

〔山本美江、宇田晶彦、堀田明豊、藤田修、棚林清〕

その他

網羅的病原体検出法に関する研究

(1) 網羅的病原体マイクロアレイによる廃棄された牛および豚臓器に含まれる病原体の検出
食肉処理場で廃棄された牛および豚臓器に含まれる病原体を調査する為、自作病原体検出用マイクロアレイを用いて網羅的病原体同定を行った。採取した 32 検体は、ホモジネートした後、SepaGene にて核酸抽出し、Alexa546 で蛍光標識した。これらの標識核酸を病原体検出用マイクロアレイと一晚ハイブリダイゼーションを行い、洗浄後、マイクロアレイスキャナーで病原体プローブと相補したサンプル核酸の蛍光強度を読み取った。この結果、2 検体から放線菌ゲノムの陽性反応が検出された。同様に、この 2 検体は PCR でも陽性反応が確認され、一部の臓器には放線菌由来核酸が含まれている可能性が示唆された。

〔宇田晶彦、藤田修、堀田明豊、山本美江、棚林清〕

発表業績一覧

I. 誌上発表

1. 欧文発表

- 1) Kimura, M., Imaoka, K., Suzuki, M., Kamiyama, T. and Yamada, A. Evaluation of a microplate agglutination test (MAT) for serological diagnosis of canine brucellosis. J. Vet. Med. Sci., 70:707-709, 2008
- 2) Nakagomi, D., Deguchi, N., Yagasaki, A., Harada, K., Shibagaki, N., Kimura, M., Imaoka, K. and Shimada, S. Rat-bite fever identified by PCR detection of *Streptobacillus moniliformis* DNA. J. Dermatol., 35:667-670, 2008
- 3) Inokuma H., Seino N., Suzuki M., Kaji K., Takahashi H., Igota H., and Inoue S. 2008. Detection of Rickettsia Helvetica DNA from Peripheral Blood of Sika Deer (*Cervus Nippon yesoensis*) in Japan. J. Wild. Dis. 44:164-167.
- 4) Nishizono A., Khawplod P., Ahmed K., Goto K., Shiota S., Mifune K., Yasui T., Takayama K., Kobayashi Y., Mannen K., Tepsumethanon V., Mitmoonpitak C., Inoue S. and

Morimoto K. 2008. A simple and rapid immunochromatographic test kit for rabies diagnosis. Microbiol. Immunol. 52:243-249.

5) Fujita O., Uda A., Hotta A., Okutani A., Inoue S., Tanabayashi K., and Yamada A. 2008. Genetic diversity of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* strains isolated in Japan. Microbiol. Immunol. 52:270-276.

6) Hotta K., Bazartseren B., Kaku Y., Noguchi A., Okutani A., Inoue S. and Yamada A. 2008. Effect of cellular cholesterol depletion on rabies virus infection. Virus Res. 139:85-90.

7) Kojima D., Chun-Ho P., Yusuke S., Inoue S., Noguchi A. and Toshifumi O. 2008. Pathology of the Spinal Cord of C57BL/6J Mice Infected with Rabies Virus (CVS-11 Strain). J. Vet. Med. Sci. 71:319-324.

8) Sato G., Kobayashi Y., Motizuki N., Hirano S., Ito T., Cunha E. M., Ito F. H., Sakai T. 2009. A unique substitution at position 333 on the glycoprotein of rabies virus street strains isolated from non-hematophagous bats in Brazil. Virus Genes. 38:74-79.

2. 和文発表

- 1) 今岡浩一. 人獣共通感染症としてのブルセラ症. Info Vets, 11(8): 12-16, 2008
- 2) 今岡浩一. ブルセラ症の治療選択における重要な指針. MMJ, 4(9): 774-775, 2008
- 3) 鈴木道雄. イヌ・ネコの咬傷に伴うパスツレラ症及びカプトサイトファーガ症とその検査. in: 感染症検査実習マニュアル, 日本獣医師会, 86-94, 2008
- 4) 今岡浩一. ブルセラ病とその検査. in: 感染症検査実習マニュアル, 日本獣医師会, 95-108, 2008
- 5) 今岡浩一. ブルセラ. in: パイオセーフティの事典 (バイオメディカルサイエンス研究会 編), みみずく舎/医学評論社, 169-171, 2008
- 6) 今岡浩一. 犬ブルセラ症の現状と課題. 日本獣医師会誌, 62(1): 5-12, 2009
- 7) 今岡浩一. ブルセラ症の最近の話題. モダンメディア, 55(3): 76-85, 2009
- 8) 井上 智. アジアの狂犬病の現状を知る. 特集: ヒトと動物の共通感染症最前線 5. 獣医畜産新法 (Journal of Veterinary Medicine). 61 : 184-187, 2008
- 9) 井上 智, 佐藤 克, 梅田浩史, 衛藤真理子. 狂犬病 (Rabies). JRA 特別振興事業 (ウエストナイルウイルス感染症等特別対策事業). 社団法人 全国家畜畜産物衛生指導協会. 2008
- 10) 井上 智. <一口メモ>人獣共通感染症. 産業保健

ハンドブック VI 職場の感染症対策（予防管理・発生時対策・臨床・補償のすべて）。監修：和田 攻。日本医師会推薦。財団法人産業医学振興財団。p32、2008

11) 井上 智。＜一口メモ＞動物由来感染症。産業保健ハンドブック VI 職場の感染症対策（予防管理・発生時対策・臨床・補償のすべて）。監修：和田 攻。日本医師会推薦。財団法人産業医学振興財団。p32-33、2008

12) 井上 智。狂犬病の診断技術向上のためのイヌの頭部解剖手技の習得モデルと教材開発の紹介。ラボテック（技術紹介）。LABIO 21。34：33-35、2008

13) 井上 智、野口 章。トピック：リッサウイルス感染症。検査と技術。36：1465-1467、2008

14) 井上 智。人獣共通感染症が侵入・発生した場合の動物側の対応。特集：海外からの人獣共通感染症の侵入危機とその対策。獣医畜産新法（Journal of Veterinary Medicine）。61：901-907、2008

15) 井上 智。（7）狂犬病ウイルス、8-4 ウイルス、第8章病原微生物の特性と対策。バイオセーフティの辞典：病原微生物とハザード対策の実際。編集：バイオメディカルサイエンス研究会。医学評論社。p258-259、2008

16) 井上 智。世界・日本の現状と獣医師の役割。再考：狂犬病（Interview 1 狂犬病研究の視点から）。MVM（Journal of Modern Veterinary Medicine）、110:6-7、2008

17) 棚林 清：野兔病 感染症 38, 18-23、2008。

II. 学 会 発 表

1. 国際学会

1) Kaku, Y., Noguchi, A., Okutani, A., Hotta, K., Bazartseren, B., Yamada, A. and Inoue, S. Inhibition of rabies virus growth by intrabody against phosphoprotein in mouse neuroblastoma cells. 42nd joint working conference on viral diseases and satellite meeting. US-Japan Cooperative Medical Science Program. 26-28 May, 2008. Nagasaki, Japan.

2) Medina, P.B., Acosta, L.P., Jarilla, B., Demetria, C.S., Malbas, F., Inoue, S. and Manalo, D.L. Development of local rabies fluorescent isothiocyanate conjugate (FITC) for direct antigen detection by fluorescent microscopy (FAT) (Preliminary results). Asian DFederation of Laboratory Animal Science. 27-29 September, 2008. China.

2. 国内学会

1) 木村昌伸, 中込大樹, 谷川力, 鈴木道雄, 今岡浩一, 山田章雄. 鼠咬症原因菌 (*Streptobacillus moniliformis*) の検出方法の確立と, クマネズミ咬傷により鼠咬症が疑われた症例からの同定. 第 82 回日本感染症学会総会, 松江,

2008 年 4 月

2) 鈴木道雄, 鈴木葉子, 木村昌伸, 今岡浩一, 山田章雄. *Capnocytophaga canimorsus* の検出法の開発と敗血症・多臓器不全を呈したイヌ咬傷感染症例における菌の同定. 第 82 回日本感染症学会総会, 松江, 2008 年 4 月

3) 中込大樹, 出口順啓, 矢ヶ崎晶子, 原田和俊, 柴垣直孝, 島田眞路, 今岡浩一, 木村昌伸. PCR 法にて *Streptobacillus moniliformis* DNA を検出した鼠咬症の一例. 第 107 回日本皮膚科学会総会, 京都, 2008 年 4 月

4) 奥谷晶子、井上 智、今岡浩一、山田章雄。Pyrosequencing による炭疽菌、ペスト菌およびブルセラ属菌の迅速同定法の確立。第 146 回日本獣医学会、2008 年 9 月、宮崎

5) 加来義浩、野口 章、Marsh Glenn、McEachern Jennifer、奥谷晶子、堀田こずえ、Bazartseren Boldbaatar、福士秀悦、山田章雄、井上 智、Wang Linfa。VSV シュードウイルスを利用したニパウイルス中和試験法の確立。第 146 回日本獣医学会、2008 年 9 月、宮崎

6) Bazartseren Boldbaatar、加来義浩、野口 章、奥谷晶子、堀田こずえ、井上 智、山田章雄。Rapid detection of rabies virus by RT-LAMP。第 56 回日本ウイルス学会、2008 年、10 月、岡山

7) 加来義浩、野口 章、奥谷晶子、堀田こずえ、Bazartseren Boldbaatar、福士秀悦、井上 智、山田章雄。VSV シュードウイルスを利用した迅速ニパウイルス中和試験法の研究。第 56 回日本ウイルス学会、2008 年 10 月、岡山

8) 堀田こずえ、加来義浩、奥谷晶子、野口 章、井上智、山田章雄。細胞膜コレステロールの枯渇が狂犬病ウイルス感染に与える影響について。第 56 回日本ウイルス学会、2008 年 10 月、岡山

9) 奥谷晶子、関塚剛史、黒田 誠、井上 智、山田章雄。日本で分離された炭疽菌の分子遺伝学的解析。第 82 回日本細菌学会総会、2009 年 3 月、名古屋

10) 芹澤昌邦、関塚剛史、奥谷晶子、井上 智、黒田 誠。セレウスグループに属する各菌種における SNP の網羅的探索と種間比較におけるその利用。第 82 回日本細菌学会総会、2009 年 3 月、名古屋

11) 関塚剛史、井上 智、黒田 誠。動物腸管内の細菌叢および原生動物叢の検出。第 82 回日本細菌学会総会、2009 年 3 月、名古屋

12) 宇田晶彦、棚林清、永田典代、山本美江、藤田修、堀田明豊、巽正志、長谷川秀樹、松田潤一郎、山田章雄。SARS コロナウイルス感染に高感受性なウイルス受容体発現マウスの作出。第 56 回日本ウイルス学会学術集会 2008 年 10 月 岡山市

3. セミナー・講演等

- 1) 内田幸憲, 鎌倉和政, 後藤郁夫, 杉本昌生, 福士秀人, 丸山総一, 岸本壽男, 今岡浩一, 吉川泰弘. 動物病院勤務者の人獣共通感染症にかかわる健康調査. 第8回人と動物の共通感染症研究会学術集会, 東京, 2008年11月
- 2) 今岡浩一. ブルセラ症とは?—ヒト・家畜・イヌ—: 教育講演. 第8回人と動物の共通感染症研究会学術集会, 東京, 2008年11月
- 3) 今岡浩一. ブルセラ症とその対応: 特別講演. 横浜市獣医師会研修会, 横浜, 2008年12月
- 4) 今岡浩一. 家畜伝染病等の食品媒介感染症—ブルセラ症の公衆疫学的側面を例として—: シンポジウム「食品の家畜伝染病起因菌等汚染と検査の問題」. 平成20年度日本獣医師会年次大会, 盛岡, 2009年1月
- 5) 今岡浩一. ブルセラ症の現状. 平成20年度希少感染症診断技術研修会, 東京, 2009年2月
- 6) Inoue, S. Rabies in Japan. Session 4: Country reports on rabies surveillance, prevention and control, legislation and policies developed, IEC, multi-sectoral collaborations and community-based model in human and animals. Workshop on strengthening cooperation and sharing information on rabies among ASEAN plus three countries. The ASEAN plus three Emerging Infectious Diseases Programme. 23-25 April 2008, Ha Long, Vietnam.
- 7) Inoue, S. and Bazartseren, B. Rabies in Japan. Meeting Salon of The State Central Veterinary Laboratory (SCVL). 22 September 2008, Ulaanbaatar, Mongol.
- 8) Inoue, S. Rabies in Japan. Diagnostic skill and advanced methods (2nd technical conference). 26 September 2008, Ulaanbaatar, Mongol.
- 9) 井上 智. 狂犬病の発生事例から知るその課題と備えについて. 兵庫県動物愛護管理推進計画策定記念研修会「狂犬病について～その発生に備えて」(平成20年度動物愛護監視員(狂犬病予防員)研修会). 兵庫県. 2008年、7月4日、神戸市
- 10) 井上 智. 狂犬病を通して知る公衆衛生の中の獣医(獣医は動物由来感染症の専門家でありリスクグループの代表). 第264回獣医学科セミナー. 北里大学獣医学部. 2008年、10月2日、十和田市、青森県
- 11) Orbina, J.R.C., Bajaro, J.D.P., Kamigaki, T., Noguchi, A., Inoue, S., Manalo, D.L., Demetria, C.S., De Guzman, A.S., Quiambao, B.P., Segubre-Mercado, E.M., Saito, M., Suzuki, A., Lupisan, S.P., Olveda, R.M., and Oshitani, H. Molecular epidemiology of rabies in the Philippines. Establishment of

methods and preliminary results. The launching of the Tohoku University-RITM collaborating research center for emerging and reemerging infectious diseases. RITM Auditorium. 20 October 2008, Manila, Philippines.

- 12) 井上 智. 疑似狂犬病検体採取の方法. 職場研修: 疑似狂犬病検体採取. 動物愛護相談センター城南島出張所. 2008年10月30日、東京都
- 13) 井上 智、松本尚美. 海外における狂犬病トピックス: 諸外国での狂犬病対応事例とタイでの狂犬病研修報告. 平成20年度 動物由来感染症対策(狂犬病を含む)技術研修会. 厚生労働省健康局結核感染症課. 2008年10月31日、北里大学薬学部コンベンションホール、東京都
- 14) 井上 智. 海外で起きた犬等の輸入狂犬病について: 我が国に必要とされる狂犬病対策の取り組み. 平成20年度 狂犬病予防注射指定獣医師等研修会. 社団法人岩手県獣医師会. 2008年11月7日、盛岡市(いわて共済ビル)、岩手県
- 15) 井上 智. 狂犬病について. 3: 世界における狂犬病の発生と対策の現状. 人と動物の共通感染症講習会. 社団法人徳島県獣医師会. 2008年12月11日、徳島市(ホテルグランドパレス徳島)、徳島県
- 16) 井上 智. 狂犬病予防: 発生を想定した取り組み. 教育講演-狂犬病と取り組む. 日本小動物獣医学会. 平成20年度日本獣医師会、学会年次大会. 2009年1月24日、盛岡市(アイーナ/マリオス)、岩手県
- 17) 井上 智. 狂犬病発生時の対応(解剖について). 全国動物管理関係事業所協議会中国・四国ブロック会議. 倉敷市保健所. 2009年1月30日、倉敷市、岡山県
- 18) 井上 智. 狂犬病の現状について. 宮崎県食品衛生監視員・食肉衛生検査所・公衆衛生獣医師協議会、獣医師会(4者合同研修会). 宮崎県総合保健センター. 2008年2月7日、宮崎市、宮崎県
- 19) 棚林 清. 霊長類(non-human primates)を介して感染する疾病について. 平成20年度予防衛生協会バイオセーフティ講習会. 医薬基盤研究所霊長類医学研究センター 2008年7月28日 つくば市
- 20) 棚林 清. 動物由来感染症について. 平成20年度獣医師高度技術研修事業. 東京大学動物医療センター 2009年1月9日 東京
- 21) 棚林 清. 野兎病の現状. 平成20年度希少感染症技術研修会. 国立感染症研究所 2009年2月25日 東京
- 22) 棚林 清. 狩猟と動物由来感染症(野兎病、鳥インフルエンザなど). 秋田由利連合猟友会研修会. 2009年3月7日 由利本荘市
- 23) 堀田明豊. ノウサギにおける野兎病の調査—これま

での結果と今後に向けてー

秋田由利連合猟友会研修会。2009年3月7日 由利本荘市

研修実績

1) 平成21年2月～(4月)

海外からの短期研究生の受け入れ

研修生：1名、Kurukshetra University, Haryana, India

より

担当教官：今岡浩一

研修内容：ブルセラ属菌の取扱と検出法について